

## **ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LOCOS MICROSSATÉLITES PARA *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnau, 1855) SILURIFORMES: PIMELODIDAE.**

Antonio Saulo Cunha MACHADO<sup>1</sup>; Kyara Martins FORMIGA<sup>2</sup>; <sup>3</sup>Mauro de Freitas ORTIZ; <sup>4</sup>Adina Cristina Barbosa de SOUSA; <sup>4</sup>José Antonio Alves GOMES e <sup>5</sup>Jacqueline da Silva BATISTA.

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; <sup>2</sup>Orientadora CPBA; LFC /INPA; <sup>3</sup>Universidade Federal do Amazonas-UFAM, Laboratório de Evolução e Genética Animal – LEGAL. <sup>4</sup>CPBA; LFC/INPA. <sup>5</sup>Co-orientadora CPBA; LFC/INPA.

Auxílio financeiro: CNPq, PROCAD/CAPES e INPA.

### **1. INTRODUÇÃO**

A bacia amazônica abrange uma área de cerca de 6.000.000 km<sup>2</sup> (Villar *et al.*, 2009) e apresenta a mais rica ictiofauna de água doce do mundo, a qual (Levêque *et al.*, 2008). Esta ictiofauna apresenta maior frequência de peixes das ordens Characiformes (43%) seguido dos Siluriformes (39%) (Lowe-McConnell 1987). Dentro dos Siluriformes, a família Pimelodidae é a mais representativa, com 93 espécies distribuídas em 30 gêneros que ocorrem nos principais rios da América do Sul (Carl e Ferraris, 2007). Dentre essas espécies se destaca o surubim (*Pseudoplatystoma punctifer*), importante para produção comercial na Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela por apresentar excelente qualidade de carne com poucos ossos intramusculares e uma alta taxa de crescimento com o potencial de alcançar 50 kg (Sato *et al.*, 1998). Essa espécie se distingue dos demais representantes do gênero, pelas seguintes características: pigmentação escura que se estende na linha lateral, com a presença de 10 a 11 barras verticais mais escuras que podem alcançar a região ventral, poucas barras verticais brancas paralelas, região ventral do corpo branca, nadadeira caudal com manchas, barbilhão do maxilar longo, estendendo-se além da nadadeira pélvica, barbilhão ventral mais curto e 3/4 do comprimento de cabeça (Buitrago-Suarez e Burr, 2007). Dados moleculares confirmam que o gênero *Pseudoplatystoma* é monofilético (Torricco *et al.*, 2009). Informações como esta se tornaram acessíveis a partir do final da década de 70, com a descoberta das enzimas de restrição, onde se intensificaram os primeiros estudos com marcadores moleculares baseados em DNA. Foi, no entanto, com o surgimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que os estudos nessa área ganharam considerável expressão (Avisé, 1994). Dentre todos os marcadores moleculares os microssatélites também chamados "simple sequence repeats (SSRs)" são um dos mais utilizados recentemente (Sunnucks, 2000), por possuírem o mais elevado conteúdo de informação a partir do polimorfismo sendo ideais para mapeamento genético e físico de genomas, identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Algumas espécies de *Pseudoplatystoma* são consideradas ameaçadas devido à grande exploração pesqueira, projetos hidroelétricos, desmatamento e contaminação (Carolsfeld *al et.*, 2003), principais fatores que contribuem para as extinções e aumentam os efeitos estocásticos ambientais e genéticos dentro das populações (Frankham *et al.*, 2008). Para o manejo e conservação das populações de *P. punctifer* é importante seu conhecimento genético, para se estimar o fluxo gênico e o grau de variabilidade genética entre as populações. Neste contexto, estudos genéticos com marcadores moleculares microssatélites são de considerável importância quando se pensa em elaboração de projetos visando à conservação para essa espécie. O presente estudo propôs-se a isolar e caracterizar locos microssatélites a partir de uma biblioteca genômica enriquecida com regiões de microssatélites para o surubim a fim de disponibilizar esses marcadores para estudos de genética populacional e da conservação dessa espécie.

### **2. Material e Métodos**

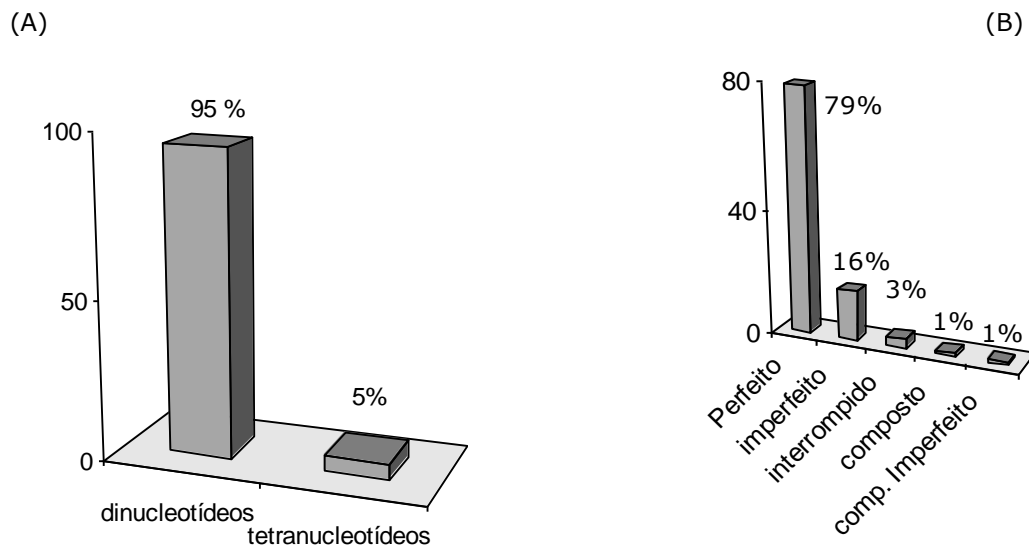
A partir de uma biblioteca genômica enriquecida com regiões de microssatélites foram realizadas duas reações de sequenciamento nucleotídico para cada clone, sendo uma reação com o *primer* T7 (*forward*) e outra com o *primer* SP6 (*reverso*), entre 40 a 100 ng do produto de PCR purificado juntamente com o reagente *Big Dye Terminator Ver 3.1* (*Applied*

*Biosystems*), tampão 2X e água ultrapura. Essa reação foi levada ao termociclador seguida da reação de precipitação e em seguida injetada em analisador automático de DNA ABI 3130 (Applied Biosystems). As seqüências nucleotídicas foram verificadas, editadas e compiladas com o auxílio dos programas CHROMAS 2.33, CHROMASPRO e BIOEDIT 7.0.9.0 (Hall, 1999). A retirada da seqüência do vetor, montagem dos *contigs* e estimativa de redundância foram realizadas com o programa SEQMAN (DNASTAR). As seqüências de DNA dos insertos de melhor qualidade foram selecionadas e analisadas com o auxílio do programa WEBSAT (Martins *et al.*, 2009) para a identificação das seqüências nucleotídicas com regiões de microssatélites e caracterização da biblioteca genômica. As seqüências nucleotídicas com microssatélites foram classificadas de acordo com o motivo de repetição (di, tri ou tetranucleotídeos) e com o tipo de seqüência repetitiva (perfeitos, imperfeitos, interrompidos ou compostos). Para o desenho dos *primers* foram utilizadas as seqüências nucleotídicas de boa qualidade contendo microssatélites com o auxílio do programa PRIMER3 (Rozen & Skaletsky, 2000) incluso no programa WEBSAT (Martins *et al.*, 2009).

Os critérios utilizados para o desenho foram: tamanho dos *primers* entre 17 e 23 pb; temperatura de anelamento entre 55 e 65°C, conteúdo de GC (guanina-citosina) de 50 a 80% e o tamanho do fragmento entre 100 a 350pb. Em cada *primer forward* desenhado foi adicionada uma seqüência nucleotídica universal (cauda de M13) na extremidade 5' no intuito de seguir-se o protocolo econômico descrito por Schuelke (2000). A amplificação dos fragmentos contendo microssatélites utilizando os pares de primers desenhados seguiu os seguintes passos: I) todos os pares de *primers* foram submetidos a PCR a 60°C de temperatura de anelamento utilizando quatro indivíduos de *P.punctifer*; II) Os fragmentos não amplificados foram submetidos a um PCR de gradiente de temperatura de anelamento entre 48°C a 65°C para seleção da temperatura de anelamento ideal. III) Cada loco microssatélite amplificado foi marcado com fluorescência *Fam* ou *Hex*, segundo metodologia de Schuelke (2000). O produto da amplificação foi visualizado e comparado com marcador - *Ladder 1kb Plus (Invitrogen)* em gel de agarose 1,5% após eletroforese por 90 minutos em corrente 120 v e em seguida foram submetidos à eletroforese capilar em Analisador de DNA megaBACE 1000 (GE healthcare) do LTBM/COPE/INPA. Foi adicionado marcador de bandas conhecido (*Size standard ET400R*) em cada amostra e o programa *Fragment Profiler 2.1 (GE HeathCare)* utilizado para estimar o tamanho e padrão dos alelos e o nível de polimorfismo dos indivíduos genotipados.

### 3. Resultados e discussão

Dos 96 clones da biblioteca, 79 possuíam insertos, 66 apresentaram boa qualidade e 56 com microssatélites, dentre estes foram observados 100 microssatélites com uma média de 1,7 microssatélites por clone, sendo estes classificados quanto ao motivo de repetição, e quanto a natureza dos microssatélites (Figura 1). Foi observado 3,44% de redundância na biblioteca genômica, uma exceção quanto ao tamanho do fragmento foi feita para o loco Ppu 3 foi feita 385pb enquanto que para os demais locos o fragmento variou entre 100pb a 350pb. Ao todo foram desenhados e sintetizados 45 pares de *primers*, cujo tamanho esperado varia entre 103 a 385 pb. Em relação aos testes, 32 locos amplificaram com temperatura de anelamento entre 51°C a 66°C (Tabela 1), e destes 21 locos foram genotipados utilizando-se entre 2 a 19 indivíduos por loco e observados 13 locos polimórficos (Tabela 2), com uma variação de 2 (Ppu18) a 10 (Ppu6) alelos observados, com o tamanho dos alelos variando de 119 pb (Ppu19) a 368pb (Ppu36)



**Figura 1:** Classificação dos microssatélites em *Pseudoplatystoma punctifer*, (A) quanto ao motivo de repetição e (B) quanto à natureza dos microssatélites.

**Tabela 1.** Locos microssatélites amplificados em *Pseudoplatystoma punctifer*, quanto ao **Motivo:** de repetição do microssatélites, **T°a:** temperatura de anelamento e tamanho do **fragmento** em pb.

Nome	Motivo	T°	Fragmento
Ppu1	(AG)9aa(AG)13aa(AG)6	60	206
Ppu3	(TG)12	58	385
Ppu6	(GT)14	58	237
Ppu7	(CA)6	65	103
Ppu8	(CA)5t(AC)5	59	157
Ppu9	(AG)15	58	272
Ppu11	(GT)7	60	241
Ppu13	(TTAT)3	59	193
Ppu14	(GA)14tat(AG)6	58	241
Ppu15	(CT)15	66	189
Ppu16	(GT)10	63	231
Ppu17	(AC)11	58	283
Ppu18	(CTAT)6	51	230
Ppu19	(TG)7	58	324
Ppu20	(CA)20	58	199
Ppu21	(GT)7	60	316
Ppu22	(CA)11cg(CA)5	58	260
Ppu24	(GT)8	60	325
Ppu25	(AC)26	60	175

Ppu26	(CA)10 cg (CA)9	60	335
Ppu27	(CT)8(AC)17	60	244
Ppu28	(TG)13	60	227
Ppu29	(AC)7ag(AC)7ag(AC)7	60	272
Ppu30	(AC)10	60	308
Ppu33	(TG)12	60	342
Ppu35	(AC)16	60	285
Ppu36	(AG)12	60	321
Ppu37	(CT)16 tg (CT) 9	60	340
Ppu38	(AC)19	60	341
Ppu40	(AC)21	60	192
Ppu41	(GT)11	60	311
Ppu43	(AC)6	66	184

**Tabela 2.** Locos microssatélites polimórficos de *Pseudoplatystoma punctifer*, **T<sup>o</sup>a**: temperatura de anelamento, **N<sup>o</sup> in**: número de indivíduos genotipados, **Tamanho (pb)**:Variação dos alelos em pares de base, **N<sup>o</sup> alelos**: números de alelos observados.

<b>Loco</b>	<b>Motivo de repetição</b>	<b>T<sup>o</sup>a</b>	<b>N<sup>o</sup>in</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>N<sup>o</sup> Alelos</b>
Ppu1	(AG)9aa(AG)13aa(AG)6	58	4	202-238	6
Ppu6	(GT)14	58	19	261-287	10
Ppu7	(CA)6	65	4	119-125	2
Ppu8	(CA)5t(AC)5	59	4	150-179	4
Ppu9	(AG)15	58	4	287-195	5
Ppu11	(GT)7	60	16	232-260	5
Ppu16	(GT)10	63	18	223-233	5
Ppu18	(CTAT)6	51	2	237-285	2
Ppu21	(GT)7	60	4	239-341	2
Ppu22	(CA)11cg(CA)5	58	4	271-277	2
Ppu28	(TG)13	60	2	242-246	3
Ppu30	(AC)10	60	2	328-332	2
Ppu36	(AG)12	60	3	342-368	5

#### 4. Conclusão.

Na caracterização da biblioteca foi obtido um bom rendimento de microssatélites, e os locos microssatélites polimórficos apresentaram de dois a 10 alelos, são marcadores potenciais não somente para serem utilizados em estudos de genética e conservação de populações naturais mais também auxiliar na identificação de estoque pesqueiro para essa espécie. Esses dados são úteis para auxiliar no subsídio de políticas de manejo e conservação para o Surubim na Amazônia.

## 5. Referências

Avise, J. C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York: Chapman and Hall.

Buiatrago-Suárez, U.A.; and Burr, B.M. 2007. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa*, vol. 1512, p. 1-38.

Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C., Baer, A., 2003. *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*. World Fisheries Trust/World Bank/ IDRC, Victoria.

Carl J. e Ferraris C.J. 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes, Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1418:1-628.

Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220 p.

Frankham, R.; Ballou, J. D.; Briscoe, D. A. 2008. *Fundamentos de Genética da Conservação* [Ribeirão Preto, SP]: Ed.SBG (Sociedade Brasileira de Genética),

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.*, 41:95-98.

Lévêque, C.; Oberdorff, T.; Paugy, D.; Stiassny, M. L. J.; and Tedesco, P. A. 2008. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia* n. 595, p. 545-567, nov..

Lowe-McConnell, R. H. 1987. *Ecological studies in tropical fish communities*. Cambridge University Press. 382

Martins, W. S.; Soares-Lucas, D. C.; Neves, F. S.; Bertioli, D.J. 2009. WebSat - A web software for microsatellite marker development. *Bioinformation*, 3(6): 282-283.

Rozen, S.; e Skaletsky, H. 2000. Primer 3 on the for general users and for biologists programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, (eds Krawetz S, Misener S), pp. 365-386. Humana Press, Totowa, New Jersey.

Sato, Y.; Cardoso, E. L.; Sallum, W. B. 1998. *Reprodução induzida do surubim da Bacia do São Francisco*. *Encontro Anual de Aqüicultura*. Belo Horizonte, 1 pp.

Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotech.*, 18: 233-234

Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Tree, London*, v.15, p.199-203.

Torrice P.; Hubert N.; Desmarais E.; Duponchelle F.; Nuñez Rodriguez J.; Montoya-Burgos J.; Garcia Davila C.; Carvajal-Vallejos F.M.; Grajales A.A.; Bonhomme F.; Renno J.F. 2009. Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): Biogeographic and evolutionary implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51, 588–594

Villar, J. C. E.; Guyot, J. L.; Ronchail, J.; Cochonneau, G.; Filizola, N. ; Fraizy, P. ; Labat, D. 2009. Contrasting regional discharge evolutions in the Amazon basin (1974–2004) *Journal of Hydrology*, n. 375, p.297–311.